

## PCT

### NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Washington D.C. 20231  
United States of America

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

18 April 1996 (18.04.96)

International application No.:

PCT/JP95/01144

Applicant's or agent's file reference:

C837-PCT

International filing date:

07 June 1995 (07.06.95)

Priority date:

07 October 1994 (07.10.94)

Applicant:

KISHIMOTO, Tadamitsu et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

12 July 1995 (12.07.95)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 730.91.11

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 28 FEB 1997

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 C837-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP95/01144	国際出願日 (日.月.年) 07.06.95	優先日 (日.月.年) 07.10.94
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>6</sup> A61K39/385, 38/20 // C12P21/08, C07K16/24, 16/28		
出願人(氏名又は名称)  中 外 製 薬 株 式 会 社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎  II <input type="checkbox"/> 優先権  III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如  V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献  VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備  VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 12.07.95	国際予備審査報告を作成した日 07.02.97	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)  瀬 下 浩 一	4C 9284  電話番号 03-3581-1101 内線 3453

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とする)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                              |   |       |      |                      |
|------------------------------|---|-------|------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時のもの               |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
- 
- |                                |   |       |    |                      |
|--------------------------------|---|-------|----|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
- 
- |                             |   |       |        |                      |
|-----------------------------|---|-------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 補正により、下記の書類が削除された。

- |                                |   |       |       |
|--------------------------------|---|-------|-------|
| <input type="checkbox"/> 明細書   | 第 | _____ | ページ   |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項     |
| <input type="checkbox"/> 図面    | 第 | _____ | ページ/図 |

3. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

4. 追加の意見 (必要ならば)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲	1-8	有
請求の範囲		無

進歩性(IS)

請求の範囲	7, 8	有
請求の範囲	1-6	無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲	1-8	有
請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明

請求の範囲1-4記載の発明に係るインターロイキン-6アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤は文献1(Harigai, M. et al., J. Rheumatol., Vol.15, No.11(1988), pp.1616-1622)に記載されていない。しかし、文献1のSUMMARY、RESULTSのNeutralization of BFDC activity of ASC culture medium by rabbit anti-BSF-2/IL-6には、インターロイキン-6アンタゴニストとしてのインターロイキン-6に対する抗体が記載されているし、INTRODUCTIONには、インターロイキン-6が慢性関節リウマチの病気の過程において重要な役割を持っていることが記載されていることから、慢性関節リウマチの病気の過程において重要な役割を持っているインターロイキン-6を阻害するインターロイキン-6アンタゴニストが慢性関節リウマチの治療剤として使用し得ることは当業者が容易に想到し得ることである。また、請求の範囲4記載のインターロイキン-6がヒトインターロイキン-6であるものは文献1に記載されていない、しかし、文献3(Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol., Vol.18(1988), pp.951-956)には、インターロイキン-6アンタゴニストであるヒトインターロイキン-6に対する抗体が記載されていることから、インターロイキン-6アンタゴニストとして文献3のものを採用することは当業者が容易に想到し得ることである。したがって、請求の範囲1-4記載の発明は進歩性を有しない。

請求の範囲1、2、5、6記載の発明に係るインターロイキン-6アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤は文献2(Yasukawa, K. et al., Toso Kenkyu Hokoku(Journal of Tosoh Research), Vol.35, No.2(1991), pp.77-91)に記載されていない。しかし、文献2の「1. はじめに」にはインターロイキン-6の作用を阻害する薬剤が慢性関節リウマチの治療薬として期待されることが記載されているし、「8. 抗マウス IL-6 レセプター抗体による IL-6 作用の阻害」にはインターロイキン-6アンタゴニストとしてのインターロイキン-6レセプターに対する抗体が記載されていることから、インターロイキン-6の作用を阻害するインターロイキン-6アンタゴニストとしてのインターロイキン-6レセプターに対する抗体を慢性関節リウマチの治療剤として使用し得ることは当業者が容易に想到し得ることである。また、請求の範囲6記載のインターロイキン-6がヒトインターロイキン-6であるものは文献2に記載されていない。しかし、文献4(Hirata, U. et al., J. Immunol., Vol.143, No.9(1989), pp.2900-2906)には、インターロイキン-6アンタゴニストであるヒトインターロイキン-6レセプターに対する抗体が記載されていることから、インターロイキン-6レセプターアンタゴニストとして文献4記載のものを採用することは当業者が容易に想到し得ることである。従って、請求の範囲1、2、5、6記載の発明は進歩性を有しない。

請求の範囲7、8記載の発明は、国際調査報告にあげられた文献に記載されておらず、また、これらの文献から自明なものでもない。

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

11 August 1997 (11.08.97)

International application No.

PCT/JP95/01144

International filing date (day/month/year)

07 June 1995 (07.06.95)

Applicant

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

\_\_\_\_\_ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference C837-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP 95/01144	International filing date (day/month/year) 07.06.95	Priority date (day/month/year) 07.10.94
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/385, 38/20//C12P21/08, C07K16/24, 16/28		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of the invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12.07.95	Date of completion of this report 07.02.97
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/J P 95/01144

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description. pages \_\_\_\_\_, as originally filed.  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand.  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed.  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19.  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand.  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings. sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed.  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand.  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings. sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP 95/01144

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	7, 8	YES
	Claims	1-6	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Rheumatoid arthritis remedy containing an IL-6 antagonist of the present invention, as described in claims 1-4, is not disclosed in document 1 [Hariagai, M. et al., J. Rheumatol., Vol. 15, No. 11 (1988), pp. 1616-1622]. However, SUMMARY and "Neutralization of BFDC activity of ASC culture medium by rabbit anti-BSF-2/IL-6" in RESULT of document 1 mention an IL-6 antibody as an IL-6 antagonist, and INTRODUCTION mentions that IL-6 plays an important role in the pathological process of rheumatoid arthritis. Therefore, a person skilled in the art could have easily conceived that an IL-6 antagonist, which inhibits IL-6 that plays an important role in the pathological process of rheumatoid arthritis, can be used as a rheumatoid arthritis remedy. On the other hand, document 1 does not mention the case in which IL-6 is an human IL-6, as disclosed in claim 4. However, document 3 [Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol., Vol. 18 (1988), pp. 951-956] mentions an human IL-6 antibody as an IL-6 antagonist. Therefore, adopting the one disclosed in document 3 as an IL-6 antagonist would have been easily conceived by a person skilled in the art. Consequently, the invention of claims 1-4 does not appear to involve an



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/JP 95/01144

inventive step.

Rheumatoid arthritis remedy containing an IL-6 antagonist of the present invention, as described in claims 1, 2, 5, and 6, is not disclosed in document 2 [Yasukawa, K. et al., Toso Kenkyu Hokoku (Journal of Tosoh Research), Vol. 35, No. 2 (1991), pp. 77-91]. However, "1. Introduction" of document 2 mentions that a remedy inhibiting IL-6's activities is promising as a rheumatoid arthritis remedy, and "8. Inhibition of IL-6 activities by an anti-mouse IL-6 R antibody" mentions an IL-6R antibody as an IL-6 antagonist. Therefore, a person skilled in the art could have easily conceived that an IL-6 R antibody, as a IL-6 antagonist which inhibits IL-6, can be used as a rheumatoid arthritis remedy. On the other hand, document 2 does not mention the case in which IL-6 is an human IL-6, as disclosed in claim 6. However, document 4 [Hirata, U. et al., J. Immunol., Vol. 143, No. 9 (1988), pp. 2900-2906] mentions an human IL-6 R antibody as an IL-6 antagonist. Therefore, adopting the one disclosed in document 4 as an IL-6 R antagonist would have been easily conceived by a person skilled in the art. Consequently, the invention of claims 1, 2, 5, and 6 does not appear to involve an inventive step.

The invention of claims 7 and 8 is neither disclosed in any of the documents cited in the ISR, nor obvious to a person skilled in the art.



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>A61K 39/395, 38/20 // C12P 21/08, C07K 16/24, 16/28</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO 96/11020</b> <b>(43) 国際公開日</b> <b>1996年4月18日(18.04.96)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP95/01144 <b>(22) 国際出願日</b> 1995年6月7日(07.06.95) <b>(30) 優先権データ</b> 特願平6/244035 1994年10月7日(07.10.94) JP <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) <b>(71) 出願人; および</b> <b>(72) 発明者</b> 岸本 忠三(KISHIMOTO, Tadamitsu)[JP/JP] 〒584 大阪府富田林市中野町3-5-31 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 三原昌彦(MIHARA, Masahiko)[JP/JP] 守屋陽一郎(MORIYA, Yoichiro)[JP/JP] 大杉義征(OHSUGI, Yoshiyuki)[JP/JP] 〒412 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP) <b>(81) 指定国</b> AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ, UG).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title : RHEUMATOID ARTHRITIS REMEDY CONTAINING IL-6 ANTAGONIST AS ACTIVE INGREDIENT</b>  <b>(54) 発明の名称</b> IL-6アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤  <b>(57) Abstract</b>  A synovial cell growth inhibitor or a rheumatoid arthritis remedy based on synovial cell growth inhibition, each containing an IL-6 antagonist such as an IL-6 antibody or an IL-6R antibody.		

(57) 要約

滑膜細胞増殖抑制剤、又は滑膜細胞増殖抑制に基づく慢性関節リウマチ治療剤の提供。

IL-6 アンタゴニスト、例えば IL-6 抗体、IL-6 R 抗体等を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤又は滑膜細胞増殖抑制剤。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BB	バルバドス	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア共和国
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	ス威士ランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KG	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KR	大韓民国	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ						

## 明 細 書

## I L - 6 アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤

## 技術分野

本発明はインターロイキン-6 アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤又は滑膜細胞増殖抑制剤に関する。

## 関連技術

慢性関節リウマチは、関節内において滑膜組織などの結合組織の異常な増殖がみられる全身性の慢性炎症疾患である (M e l n y k ら、A r t h r i t i s R h e u m. 33 : 493 - 500, 1990)。慢性関節リウマチ患者の関節では、滑膜細胞の著明な増殖、滑膜細胞の異常な増殖による多層構造の形成 (p a n n u s 形成)、滑膜細胞の軟骨組織や骨組織への浸潤、滑膜組織への血管新生およびリンパ球やマクロファージといった炎症細胞の浸潤などが認められる。慢性関節リウマチの発症の機序として、これまで遺伝、細菌感染あるいは各種のサイトカインや成長因子の関与が報告されているが、いまだその発症のメカニズムは不明である。

最近では、慢性関節リウマチ患者の滑膜および滑液中にはインターロイキン-1 (I L - 1)、インターロイキン-8 (I L - 8)、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (T N F  $\alpha$ )、トランスフォーミング成長因子  $\beta$  (T G F  $\beta$ )、線維芽細胞成長因子 (F G F) および血小板由来成長因子 (P D G F) 等のサイトカインまたは成長因子が検出されたとの報告があり (N o u r i ら、C l i n. E x p. I m m u n o l. 55 : 295 - 302, 1984, T h o r n t o n ら、C l i n. E x p. I m m u n o l. 86 : 79 - 86, 1991, S

axneら、Arthritis Rheum. 31:1041-1045, 1988, Seitzら、J. Clin. Invest. 87:463-469, 1991, Lafyatisら、J. Immunol. 143:1142-1148, 1989, Melnykら、Arthritis Rheum. 33:493-500, 1990)、

特に、IL-1, TNF $\alpha$ およびPDGFが有力な滑膜増殖因子であると考えられている(Thorntonら、Clin. Exp. Immunol. 86:79-86, 1991, Lafyatisら、J. Immunol. 143:1142-1148, 1989, Gitterら、Immunology 66:196-200, 1989)。また、IL-1やTNFの刺激により滑膜細胞がインターロイキン-6(IL-6)を産生することが示唆されている(Itoら、Arthritis Rheum. 35:1197-1201, 1992)。

IL-6はB細胞刺激因子2あるいはインターフェロン $\beta$ 2と称されたサイトカインである。IL-6はBリンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され(Hirano, T. ら、Nature 324, 73-76, 1986)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能をサイトカインであることが明らかになった(Akira, S. ら、Adv. in Immunology 54, 1-78, 1993)。IL-6は、細胞上で二種のタンパク質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80KDのリガンド結合性タンパク質、IL-6レセプター(IL-6R)である。

IL-6Rは、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6R(sIL-6

R)としても存在する。もう一つは非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約130KDのgp130である。IL-6とIL-6RはIL-6/IL-6R複合体を形成し、次いでもう一つの膜タンパク質gp130と結合することにより、IL-6の生物学的活性が細胞に伝達される(Tagaら、J. Exp. Med. 196:967, 1987)。

慢性関節リウマチ患者の血清あるいは滑液には、過剰な量のインターロイキン-6(IL-6)と可溶性IL-6レセプター(sIL-6R)が存在することが報告され(Houssiauら、Arthritis Rheum. 31:784-788, 1988, Hiranoら、Eur. J. Immunol. 18:1797-1801, 1988, Yoshiokaら、Japn. J. Rheumatol. in press)、関節リウマチモデル動物でも同様の結果が得られている(Takaiら、Arthritis Rheum. 32:594-600, 1989, Leistenら、Clin. Immunol. Immunopathol. 56:108-115, 1990)ことからIL-6が慢性関節リウマチとなんらかの係わりを有すると推察されている。

さらに、特開平4-89433には、IL-6産生を強く促進するペプチドが慢性関節リウマチの治療に有効であることが開示されている。

一方、Higakiらは、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞はIL-6に対する増殖反応が低く、IL-6が滑膜の増殖に対して抑制的に働くとしている(臨床免疫、22:880-887, 1990)。このように、IL-6と慢性関節リウマチの関係については相反する結果が報告されており、未だその関係は解明されていない。

最近、W e n d l i n gらは、抗 I L - 6 抗体を慢性関節リウマチ患者に投与し、一時的に臨床的、生物学的な症状が改善されると同時に、血清中の I L - 6 レベルが上昇することを報告している（J. R h e u m a t o l. 20 : 259 - 262, 1993）。

これらの報告では、I L - 6 が慢性関節リウマチ滑膜細胞の増殖を促進しているか、あるいは抑制的に作用するのかについてはなんらデータもなく、慢性関節リウマチ患者の滑膜細胞に対して I L - 6 が直接関与しているか否かは依然として不明であった。

#### 発明の開示

これまで関節リウマチの治療には、抗炎症剤であるコルチコステロイドなどのステロイド剤が使用されていたが、これらを長期的に使用すると皮膚組織の損傷や副腎皮質の機能抑制といった好ましくない副作用が生ずることから副作用が少ない薬剤の登場が待たれていた。

本発明の目的は、前記の欠点を有さない新しい慢性関節リウマチ治療剤を提供することである。より詳しくは、本発明はインターロイキン - 6 アンタゴニストを有効成分とし、慢性関節リウマチの滑膜細胞の異常増殖抑制剤、及びこの作用を有する慢性関節リウマチ治療剤を提供する。

本発明者らは、I L - 6 の関節リウマチ由来の滑膜細胞に対する役割を鋭意研究してきたが、I L - 6 だけでは関節リウマチ由来滑膜細胞の増殖が認められなかったことから、I L - 6 以外の因子について検索した結果、I L - 6 単独では滑膜細胞の増殖作用をほとんど示さないのに対し、I L - 6 と可溶性 I L - 6 R の共存下では、強力な滑膜細胞増殖作用を持つこと、さらには、この滑膜細胞増殖作用が I L - 6 抗体あるいは I L - 6 R 抗体といった I L - 6 活

性を阻害するアンタゴニストを添加することにより抑制されることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は I L - 6 アンタゴニストを有効成分として含有する慢性関節リウマチ治療剤に関する。より詳しくは、本発明は I L - 6 アンタゴニストを有効成分として含有する滑膜細胞の異常な増殖を抑制する慢性関節リウマチ治療剤に関する。本発明はさらに、I L - 6 アンタゴニストを有効成分とする滑膜細胞増殖抑制剤に関する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、I L - 6 または s I L - 6 R 単独存在下、あるいは I L - 6 および s I L - 6 R 共存下での滑膜細胞の  $^3\text{H}$  チミジン取込み量を示す。

図 2 は、I L - 1  $\beta$  および s I L - 6 R 共存下における I L - 6 抗体あるいは I L - 6 R 抗体添加時の滑膜細胞の  $^3\text{H}$  チミジン取込み量を示す。

図 3 は、I L - 6 および s I L - 6 R 共存下における I L - 6 抗体あるいは I L - 6 R 抗体添加時の滑膜細胞の  $^3\text{H}$  チミジン取込み量を示す。

図 4 は、コラーゲン投与マウス関節炎モデルに I L - 6 レセプター抗体を投与した時の関節炎点数 (a r t h r i t i c i n d e x) を示す。

図 5 は、コラーゲンを免疫した後のマウスの血中抗コラーゲン抗体価の推移を示す。

図 6 は、コラーゲン免疫マウスの後肢関節の組織切片の写真である。(a) は I L - 6 レセプター抗体投与群マウスの、(b) コントロール抗体投与群マウスの写真を示す。I L - 6 レセプター抗体



投与群では、肉芽組織の軟骨、骨への侵潤（慢性増殖性滑膜炎）が明らかに抑制されている。

### 具体的な説明

本発明の慢性関節リウマチ治療剤とは、慢性関節リウマチ患者に投与することにより、関節の滑膜細胞の増殖を抑制し、症状の緩和および治療効果を有する薬剤である。

本発明で使用される I L - 6 アンタゴニストは、I L - 6 によるシグナル伝達を遮断し、I L - 6 の生物学的活性を阻害するものであれば、その由来を問わない。I L - 6 アンタゴニストとしては、I L - 6 抗体、I L - 6 R 抗体、g p 1 3 0 抗体、I L - 6 改変体、I L - 6 R のアンチセンスあるいは I L - 6 または I L - 6 R の部分ペプチド等が挙げられる。

本発明でアンタゴニストとして使用される抗体、たとえば、I L - 6 抗体、I L - 6 R 抗体、あるいは g p 1 3 0 抗体はその由来および種類（モノクローナル、ポリクローナル）を問わないが、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。これら抗体は I L - 6 , I L - 6 R あるいは g p 1 3 0 と結合することにより、I L - 6 と I L - 6 R または I L - 6 R と g p 1 3 0 の結合を阻害して I L - 6 のシグナル伝達を遮断し、I L - 6 の生物学的活性を阻害する抗体である。

モノクローナル抗体の産生細胞の動物種は哺乳類であれば特に制限されず、ヒト抗体またはヒト以外の哺乳動物由来であってよい。ヒト以外の哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、その作成の簡便さからウサギあるいはげっ歯類由来のモノクローナル抗体が好ましい。げっ歯類としては、特に制限されないが、マウス、ラット、ハムスターなどが好ましく例示される。

このような抗体は、IL-6抗体としては、MH166 (Matsudaら、Eur. J. Immunol. 18:951-956, 1988) やSK2抗体 (Satoら、第21回日本免疫学会総会、学術記録、21:116, 1991) 等が挙げられる。IL-6R抗体としては、PM-1抗体 (Hirataら、J. Immunol. 143:2900-2906, 1989)、AUK12-20抗体、AUK64-7抗体あるいはAUK146-15抗体 (国際特許出願公開番号WO92-19759) などが挙げられる。gp130抗体としては、AM64抗体 (特開平3-219894) が挙げられる。

これらのうちでも特に、PM-1抗体が好ましい。

モノクローナル抗体は、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作成できる。すなわち、IL-6、IL-6Rあるいはgp130を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作成できる。

より具体的には、モノクローナル抗体を作成するには次のようにすればよい。例えば、前記感作抗原としては、ヒトIL-6の場合、Hiranoら、Nature, 324:73, 1986に開示されたヒトIL-6の遺伝子配列を用いることによって得られる。ヒトIL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-6タンパク質を精製し、この精製IL-6タンパク質を感作抗原として用いればよい。

ヒトIL-6Rの場合、欧州特許出願公開番号EP325474

号に開示された遺伝子配列を用いて上記ヒト IL-6 と同様の方法に従えば IL-6 R タンパク質を得ることができる。IL-6 R は細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱している可溶性のもの (s IL-6 R) との二種類がある。s IL-6 R は細胞膜に結合している IL-6 R の主に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型 IL-6 R と異なっている。

ヒト gp130 の場合、欧州特許出願公開番号 EP 4 1 1 9 4 6 に開示されている遺伝子配列を用いて上記 IL-6 と同様の方法に従えば、gp130 タンパク質を得ることができる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはマウス、ラット、ハムスター、ウサギ等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量併用して、哺乳動物に 4-21 日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3

x 6 3 A g 8 . 6 5 3 ) ( J . I m m n o l . 1 2 3 : 1 5 4 8 ,  
1 9 7 8 ) , p 3 - U 1 ( C u r r e n t T o p i c s i n  
M i c r o - b i o l o g y a n d I m m u n o l o g y 8  
1 : 1 - 7 , 1 9 7 8 ) , N S - 1 ( E u r . J . I m m u n o l  
. 6 : 5 1 1 - 5 1 9 , 1 9 7 6 ) , M P C - 1 1 ( C e l l , 8  
: 4 0 5 - 4 1 5 , 1 9 7 6 ) , S P 2 / 0 ( N a t u r e , 2 7  
6 : 2 6 9 - 2 7 0 , 1 9 7 8 ) , F O ( J . I m m u n o l . M  
e t h . 3 5 : 1 - 2 1 , 1 9 8 0 ) , S 1 9 4 ( J . E x p . M  
e d . 1 4 8 : 3 1 3 - 3 2 3 , 1 9 7 8 ) , R 2 1 0 ( N a t u  
r e , 2 7 7 : 1 3 1 - 1 3 3 , 1 9 7 9 ) 等が好適に使用される。  
。前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は基本的には公知の  
方法、たとえば、ミルステインらの方法 ( M i l s t e i n ら、M  
e t h o d s E n z y m o l . 7 3 : 3 - 4 6 , 1 9 8 1 ) 等に  
準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在  
下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば  
、ポリエチレングリコール ( P E G ) 、センダイウイルス ( H V J  
 ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチル  
スルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ  
細胞に対して免疫細胞を 1 - 1 0 倍とするのが好ましい。前記細胞  
融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増  
殖に好適な R P M I 1 6 4 0 培養液、M E M 培養液、その他、この  
種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに  
、牛胎児血清 ( F C S ) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培  
養液中でよく混合し、予め、3 7 ° C 程度に加温した P E G 溶液、例

例えば、平均分子量 1000-6000 程度の PEG を通常、培養液に 30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローン化が行われる。

このようにして作成されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の実験培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

さらに、前記の方法により得られるモノクローナル抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法等の通常の高純度精製手段を利用して高純度に精製することができる。

このようにして、作成されるモノクローナル抗体は、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA, ELISA）、蛍光抗

体法 (Immunofluorescence Analysis) 等の通常の免疫学的手段により抗原を高感度かつ高精度で認識することを確認することができる。

本発明に使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体に限られるものではなく、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変したものであってよい。例えば、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウスのモノクローナル抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域とからなるキメラ抗体を使用することができ、このようなキメラ抗体は、既知のキメラ抗体の製造方法、特に遺伝子組換技法を用いて製造することができる。

さらに、再構成 (reshaped) したヒト抗体を本発明に用いることができる。これはヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域をヒト抗体の相補性決定領域へ置換したものであり、その一般的な遺伝子組換手法も知られている。その既知方法を用いて、本発明に有用な再構成ヒト型抗体を得ることができる。例えば、このような再構成ヒト抗体として、hPM-1が好ましい (国際特許出願公開番号WO 92-19759を参照)。

なお、必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク (FR) 領域のアミノ酸を置換してもよい (Satoら、Cancer Res. 53: 851-856, 1993)。さらには抗原に結合し、IL-6の活性を阻害するかぎり抗体の断片、たとえば、FabあるいはFv、H鎖とL鎖のFvを一本鎖となるよう適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) をコードする遺伝子を構築し、これを適当な宿主細胞で発現させ、前述の目的に使用することができる。(例えば、Birdら、TIBTECH

, 9 : 1 3 2 - 1 3 7, 1 9 9 1 ; H u s t o n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A, 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3, 1 9 8 8 を参照)。

本発明で使用される I L - 6 改変体としては B r a k e n h o f f ら、J . B i o l . C h e m . 2 6 9 : 8 6 - 9 3, 1 9 9 4 あるいは S a v i n o ら、E M B O J . 1 3 : 1 3 5 7 - 1 3 6 7, 1 9 9 4 に開示されたものが挙げられる。

I L - 6 改変体としては、I L - 6 のアミノ酸配列中に置換、欠失、挿入といった変異を導入することにより、I L - 6 R との結合活性を維持したまま、I L - 6 のシグナル伝達作用がないものを使用される。さらにその由来となる I L - 6 は上記の性質を有する限り、その動物種を問わないが、抗原性を考慮すればヒト由来のものを使用するのが好ましい。

具体的には、I L - 6 のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、W H A T I F ( V r i e n d ら、J . M o l . G r a p h i c s, 8 : 5 2 - 5 6, 1 9 9 0 ) を用いてその二次構造を予測し、さらに変異アミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適当な変異アミノ酸残基を決定した後、ヒト I L - 6 遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われる P C R ( ポリメラーゼチェーンリアクション ) 法により変異を導入することにより、I L - 6 改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、大腸菌細胞や哺乳類細胞で発現させ、培養上清中に含まれたまま、あるいは通常の手法により、これを単離精製し、I L - 6 R に対する結合活性および I L - 6 のシグナル伝達の中和活性を評価することができる。

本発明で使用される I L - 6 部分ペプチドあるいは I L - 6 R 部

分ペプチドは、各々 I L - 6 R あるいは I L - 6 に結合し、I L - 6 の活性伝達作用がないものであれば、その配列を問わない。I L - 6 部分ペプチドおよび I L - 6 R 部分ペプチドについては、米国特許公報 U S 5 2 1 0 0 7 5 を参照のこと。I L - 6 R アンチセンスオリゴヌクレオチドについては特願平 5 - 3 0 0 3 3 8 を参照のこと。

本発明の I L - 6 アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤は、I L - 6 のシグナル伝達を遮断し、I L - 6 により惹起された滑膜細胞の異常な増殖が抑制される限り、これが関与する慢性関節リウマチの治療に有効である。すなわち実施例 1 は、i n v i t r o でのリウマチ患者由来滑膜細胞の増殖抑制効果を示す。実施例 2 のデータは、II型コラーゲンを免疫したマウス関節炎モデルにおいて I L - 6 レセプター抗体を投与し、(1) 関節炎点数を指標とした関節炎発症の抑制 (図 4)、(2) コラーゲン免疫マウスの血中の抗 II 型コラーゲン抗体価の抑制 (図 5)、及び (3) I L - 6 レセプター抗体を投与した関節炎モデルマウスの後肢関節における軟骨、骨への肉芽組織の侵潤 (慢性増殖性滑膜炎) の抑制 (図 6) について検討したものである。

その結果、上記 (1) 及び (2) については、マウスモデルでの関節炎発症の、特にその初期に I L - 6 レセプター抗体の抑制効果が認められた。また、(3) の結果は、軟骨、骨組織への肉芽組織の侵潤が抑制され、これは実施例 1 (i n v i t r o での滑膜細胞の増殖抑制) の結果を支持することが明らかになった。

(1) 及び (2) の実験結果は、本願発明の慢性関節リウマチ治療剤が初期の関節リウマチに優れた効果を有することを示すものである。

本発明の慢性関節リウマチ治療剤は、好ましくは非経口的に、た



例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身あるいは局部的に投与することができる。さらに、少なくとも一種の医薬用担体または希釈剤とともに医薬組成物やキットの形態をとることができる。

本発明の慢性関節リウマチ治療剤のヒトに対する投与量は患者の病態、年齢あるいは投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することが必要である。例えば、およそ1 - 1000 mg/患者の範囲で4回以下の分割容量を選択することができる。しかしながら、本発明の関節リウマチ治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

本発明の関節リウマチ治療剤は常法にしたがって製剤化することができる。たとえば、注射用製剤は、精製されたIL-6アンタゴニストを溶剤、たとえば、生理食塩水、緩衝液などに溶解し、それに、吸着防止剤、たとえば、Tween 80、ゼラチン、ヒト血清アルブミン(HSA)などを加えたものであり、または、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては例えばマンニトール、ブドウ糖などの糖アルコールや糖類を使用することができる。

## 実施例

以下、実施例、参考例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

### 参考例 1. ヒト可溶性 IL-6 レセプターの調製

Yamasakiらの方法(Science, 241: 825-828, 1988)に従い得られたヒトIL-6レセプター(IL-6R)をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R. 236を用いて、PCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)法に

より可溶性 IL-6R を作成した (Yasukawa ら、J. Biochem. 108 : 673-676, 1990)。

上記プラスミド pBSF2R. 236 を制限酵素 Sph I で消化して、IL-6R cDNA 断片を得、これを mp18 (Amersham 製) に挿入した。IL-6R cDNA にストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマー ATATTCTCTAGAGAGATTCT を用いて、インビトロミュータジェネシスシステム (Amersham 製) により、PCR 法で IL-6R cDNA に変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸 345 の位置に導入され、可溶性 IL-6R (sIL-6R) をコードする cDNA が得られた。

sIL-6R cDNA を CHO 細胞で発現するために、dihydrofolate reductase (dhfr) をコードする cDNA が制限酵素 Pvu I 切断部位に挿入されたプラスミド pECEdhfr (Clauser ら、Cell, 45 : 721-735, 1986) に Hind III - Sal I で切断した上記 sIL-6R cDNA を挿入し、CHO 細胞発現プラスミド pECEdhfr 344 を得た。

10  $\mu$ g のプラスミド pECEdhfr 344 を dhfr<sup>-</sup> CHO 細胞株 DXB-11 (Urland ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220, 1980) へカルシウムフォスフェイト沈降法 (Chen ら、Mol. Cell Biol. 7 : 2745-2751, 1987) により、トランスフェクトした。

トランスフェクトした CHO 細胞を 1mM グルタミン、10% 透析 Fetal Calf Serum (FCS)、100 U/ml のペニシリンおよび 100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシンを含むヌクレ

オシド不含 $\alpha$ MEM選択培養液で3週間培養した。選択されたCHO細胞を限界希釈法でスクリーニングし、一つの単一CHO細胞クローンを得た。このCHO細胞クローンを20nM~200nMの濃度のメトトレキセート(MTX)で増幅し、ヒトsIL-6R産生CHO細胞株5E27を得た。

CHO細胞株5E27を5%FCSを含むイスコーブ改変ダルベコ培養液(IMDM, Gibco製)で培養し、その培養上清を回収し、培養上清中のsIL-6Rの濃度をELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)法にて常法にしたがい測定した。

#### 参考例 2. ヒトIL-6抗体の調製

Matsudaらの方法(Eur. J. Immunol. 18: 951-956, 1988)により、ヒトIL-6抗体を調製した。

10 $\mu$ gの組換え型IL-6(Hiranoら、Immunol. Lett., 17: 41, 1988)をフロイント完全アジュバントとともにBALB/cマウスを免疫し、血清中に抗IL-6抗体が検出できるまで一週間毎にこれを続けた。

局所のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリエチレングリコール1500を用いてミエローマ細胞株P3U1と融合させた。ハイブリドーマをHAT培養液を用いるOiらの方法(Selective Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980)に従って選択し、ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマは下記のようにしてIL-6結合アッセイをおこなった。

すなわち、柔軟なポリビニル製の96ウェルマイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製、Alexandria, VA) を0.1Mのcarbonate-hydrogen carbonate緩衝液 (pH9.6) 中で100  $\mu$ lのヤギ抗マウスIg抗体 (10  $\mu$ l/ml, Cooper Biomedical, Inc 製 Malvern, PA) により4℃で一晩コートした。次いで、プレートを100  $\mu$ lの1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSにより室温で2時間処理した。これをPBSで洗浄した後、100  $\mu$ lのハイブリドーマ培養上清を各ウェルへ加え、4℃にて一晩インキュベートした。

プレートを洗浄して、2000 cpm / 0.5 ng / ウェルとなるように  $^{125}$ I 標識組換え型 IL-6 を各ウェルへ添加し、洗浄した後各ウェルの放射活性をガンマカウンター (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) で測定した。216個のハイブリドーマクローンのうち32個のハイブリドーマクローンがIL-6結合アッセイにより陽性であった。これらのクローンのなかで最終的に安定なMH166, BSF2が得られた。該ハイブリドーマが産生するIL-6抗体MH166はIgG1 $\kappa$ 型のサブタイプを有する。

ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマ細胞株MH60, BSF2 (Matsudaら、Eur. J. Immunol. 18: 951-956, 1988) を用いてMH166抗体によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を調べた。MH60, BSF2細胞を $1 \times 10^4$  / 200  $\mu$ l / ウェルとなるように分注し、これにMH166抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、15.1 Ci / mmolの $^3$ Hチミジン (New England Nuclear, Boston, MA) を加えた後、更に6時間培養を続け

た。

細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan) で処理した。コントロールとしてウサギ抗 IL-6 抗体を用いた。その結果、MH166 抗体は IL-6 により誘導される MH60. BSF2 細胞の  $^3\text{H}$ チミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166 抗体は IL-6 の活性を中和することが明らかとなった。

### 参考例 3. ヒト IL-6 レセプター抗体の調製

Hirata らの方法 (J. Immunol., 143: 2900-2906, 1989) により作成した抗 IL-6 R 抗体 MT18 を CNBr により活性化させたセファロース 4B (Pharmacia Fine Chemicals 製、Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、これを用いて IL-6 R (Yamasaki ら、Science 241: 825-828, 1988) を精製した。

ヒトミエローマ細胞株 U266 を 1% ジギトニン (Wako Chemicals 製)、10 mM トリエタノールアミン (pH 7.8) および 0.15 M NaCl を含む 1 mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオリドハイドロクロリド (Wako Chemicals 製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース 4B ビーズと結合させた MT18 抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で 6 回洗浄し、免疫に用いる部分精製 IL-6 R とした。

BALB/c マウスを  $3 \times 10^8$  個の U266 細胞から得た上記部分精製 IL-6 R で 10 日おきに 4 回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性ウェルからのハイブリドーマ

培養上清を下記の方法にて IL-6R への結合活性を調べた。  $5 \times 10^7$  個の U266 細胞を  $^{35}\text{S}$ -メチオニン (2.5 mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。可溶化した U266 細胞を 0.04 ml 容量のセファロース 4B ビーズと結合させた MT18 抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で 6 回洗浄し、0.25 ml のジギトニン緩衝液 (pH 3.4) により  $^{35}\text{S}$ -メチオニン標識 IL-6R を流出させ、0.025 ml の 1M Tris (pH 7.4) で中和した。

0.05 ml のハイブリドーマ培養上清を 0.01 ml の Protein G セファロース (Pharmacia 製) と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した 0.005 ml の  $^{35}\text{S}$  標識 IL-6R 溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質を SDS-PAGE で分析し、IL-6R と反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローン PM-1 を樹立した。ハイブリドーマ PM-1 から産生される IL-6R 抗体 PM-1 は、IgG1 $\kappa$  型のサブタイプを有する。

ハイブリドーマ PM-1 が産生する抗体のヒト IL-6R に対する IL-6 の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株 U266 を用いて調べた。ヒト組換え型 IL-6 を大腸菌より調製し (Hirano ら、Immunol. Lett., 17: 41, 1988)、ボルトン-ハンター試薬 (New England Nuclear, Boston, MA) により  $^{125}\text{I}$  標識した (Taga ら、J. Exp. Med. 166: 967, 1987)。

$4 \times 10^5$  個の U266 細胞を 100 倍量の過剰な非標識 IL-6 の存在下で室温にて、1 時間、70% (v/v) のハイブリドーマ PM-1 の培養上清および 14000 cpm の  $^{125}\text{I}$  標識 IL-6 とともに培養した。70  $\mu\text{l}$  のサンプルを、400  $\mu\text{l}$  のマイクロ

フュージポリエチレンチューブに入れた  $300\mu\text{l}$  の FCS 上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。

その結果、ハイブリドーマ PM-1 が産生する抗体は、IL-6 の IL-6 R に対する結合を阻害することが明らかとなった。

#### 参考例 4. マウス IL-6 レセプター抗体の調製

特願平 6-134617 に記載の方法でマウス IL-6 レセプターに対するモノクローナル抗体を調製した。

Saito らの方法 (J. Immunol., 147, 168-173, 1993) に従い、マウス可溶性 IL-6 レセプターを産生する CHO 細胞を 10% FCS を含む IMDM 培養液で培養し、その培養上清からマウス可溶性 IL-6 レセプター抗体 RS12 (上記 Saito 参照) と Affigc1 10 ゲル (Biorad) に固定したアフィニティーカラムを用いてマウス可溶性 IL-6 レセプターを精製した。

得られたマウス可溶性 IL-6 レセプター  $50\mu\text{g}$  をフロイント完全アジュバントと混合しウィスターラット (日本チャールズリバー) の腹部皮下に注射した。2週間後からはフロイント不完全アジュバントで追加免疫した。45日目にラットを屠殺し、その脾細胞約  $2 \times 10^8$  個を  $1 \times 10^7$  個のマウスミエローマ細胞 P3U1 と 50% の PEG1500 (ベーリンガーマンハイム) を用いて常法により細胞融合させた後、HAT 培地にてハイブリドーマをスクリーニングした。

ウサギ抗ラット IgG 抗体 (カップル) をコートしたイミュノプレートにハイブリドーマ培養上清を加えた後マウス可溶性 IL-6 レセプターを反応させ、次いでウサギ抗マウス IL-6 レセプター抗体およびアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギ IgG による ELISA 法によりマウス可溶性 IL-6 レセプターに対する

抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。抗体の産生が確認されたハイブリドーマクローンは2回のサブスクリーニングを行い、単一のハイブリドーマクローンを得た。このクローンをMR 16-1と名付けた。

このハイブリドーマが産生する抗体のマウスIL-6の情報伝達における中和活性をMH 60. BSF 2細胞(Matsuda ら、J. Immunol., 18, 951-956, 1988)を用いた<sup>3</sup>Hチミジンの取込みで調べた。96ウェルプレートにMH 60. BSF 2細胞を $1 \times 10^4$ 個/200  $\mu$ l/ウェルとなるように調製し、これにマウスIL-6(10 pg/ml)とMR 16-1抗体またはRS 12抗体を12.3-1000 ng/mlを加えて37°C、5%CO<sub>2</sub>で44時間培養した後、<sup>3</sup>Hチミジン(1  $\mu$ Ci/ウェル)を加え4時間後の取込みを測定した。その結果、MR 16-1抗体はMH 60. BSF 2細胞の<sup>3</sup>Hチミジンの取込みを抑制した。

#### 実験例 1. 慢性関節リウマチ由来滑膜細胞の樹立

##### (1) 滑膜細胞の調製

慢性関節リウマチ患者の関節を外科的に処置する際、滑膜組織を得た。滑膜組織をハサミにより細切し、ついで5 mg/mlのTYPE I コラーゲナーゼ(Sigma Chemical Co製)および0.15 mg/mlのウシ脾臓由来DNase(Sigma Chemical Co製)によりIMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium)培養液中で、37°C 1時間インキュベートすることで酵素的に分解し、メッシュを通して単一細胞を得た。得られた細胞を細胞培養用のフラスコ中で5% FCS添加IMDM培養液を用いて一晩培養した後、非附着性細胞を除去し滑膜細胞を得た。この滑膜細胞を、三継代から六継代培養したものを下記の実験に使用した。



## (2) 滑膜細胞による IL-6 産生

上記で得られた滑膜細胞を  $3 \times 10^3$  個/ウェルとなるように 5% FCS (Hyclone Laboratories Inc 製)、10 U/ml のペニシリン G および  $100 \mu\text{g/ml}$  のストレプトマイシンを含む IMDM 培養液で懸濁した後、96 ウェルマイクロタイタープレート (Falcon 製) に分注し、ヒトインターロイキン- $1\beta$  (IL- $1\beta$ )、ヒト腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、ヒト血小板由来成長因子 (PDGF) AB およびヒト塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) を各々 0.01 または 0.1、0.1 または 1、1 または 10、及び 1 または  $10 \text{ ng/ml}$  の濃度になるように加え、 $37^\circ\text{C}$  にて 72 時間培養し、その培養上清を回収した。

$100 \mu\text{l}$  の抗ヒト IL-6 抗体 MH166 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) を 96 ウェル ELISA プレート (Immunoplate; Nunc 製) に加え、 $4^\circ\text{C}$  にて 24 時間インキュベートした。ついで、各ウェルを 0.05% Tween 20 を含む PBS により洗浄して、1% BSA を含む PBS で一晩  $4^\circ\text{C}$  でブロッキングした。次いで、上記で得られた培養上清を 1% BSA を含む PBS で希釈し、各ウェルへ添加した後、室温にて 2 時間インキュベートした。0.05% の Tween 20 を含む PBS で洗浄の後、 $100 \mu\text{l}$  のプロテイン A カラム (Pharmacia 製) で精製した  $2.5 \mu\text{g/ml}$  の精製ウサギポリクローナル抗ヒト IL-6 抗体を加えた。

室温で 2 時間インキュベートした後、培養上清中の IL-6 に結合したウサギポリクローナル抗 IL-6 抗体をアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ IgG 抗体 (Tago 製) を反応させた後、添付の処方にしたがい  $1 \text{ mg/ml}$  の Sigma 104 アルカリフォスファターゼ基質 (Sigma 製) を加え、マイクロプレートリーダー MPR A4 (Tosoh Co 製) により 405-600 nm の吸

光度を測定した。

吸光度のOD値をヒトIL-6の濃度へ変換するために、各アッセイ時に組換え型IL-6を用いて検量線を作成した。結果を表1に示す。

表 1  
滑膜細胞によるIL-6産生増強

処 理 (ng/ml)		IL-6 (ng/ml)
無添加		0.096 ± 0.012
IL-1 $\beta$	0.01	6.743 ± 0.178
	0.1	17.707 ± 0.259
TNF $\alpha$	0.1	0.575 ± 0.008
	1	1.688 ± 0.034
PDGF-AB	1	0.163 ± 0.035
	10	0.165 ± 0.016
bFGF	1	0.181 ± 0.009
	10	0.230 ± 0.019

注 滑膜細胞をIL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、PDGF-ABまたはbFGFと共に3日間培養した。培養後、上清中のIL-6濃度をELISAにより測定した。

その結果、IL-1 $\beta$ は、滑膜細胞のIL-6産生を強く促進することが明らかとなった。

### 実施例 1.

(1) 実験例 1 で得られた滑膜細胞 ( $3 \times 10^3$  / ウェル) を 5 % FCS (Hyclone Laboratories Inc 製)、10 U/ml のペニシリン G および 100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシンを含む IMDM 培養液中で懸濁した後、96 ウェルマイクロタイタープレート (#3072; Falcon 製) に分注し、5 日間、各種の濃度の IL-6, sIL-6 R 各々単独存在下、あるいは IL-6 と sIL-6 R の共存下で培養した。培養開始後 72 時間後に 1  $\mu$ Ci / ウェルとなるように  $^3$ H チミジン (Amersham International plc 製) を各ウェルに添加し、培養終了後にシンチレーションカウンターにより細胞内の放射活性を測定した。結果を図 1 に示す。

その結果、IL-6 あるいは sIL-6 R 単独では、滑膜細胞の  $^3$ H チミジンとりこみは低く、滑膜細胞の増殖が認められなかった。これに対し、10 ng/ml 以上の濃度の IL-6 と 100 ng/ml の濃度の sIL-6 R の共存下ではコントロール群に比し、顕著な  $^3$ H チミジンとりこみがみられた。したがって、IL-6 単独では滑膜細胞の増殖作用をほとんど示さないのに対し、IL-6 と sIL-6 R の共存下では、強力な滑膜細胞増殖作用を持つことが明らかとなった。

(2) 滑膜細胞 ( $3 \times 10^3$  / ウェル) を、IL-6 を産生させるに十分量の IL-1  $\beta$  (0.1 ng/ml)、100 ng/ml の sIL-6 R および 25  $\mu$ g/ml の IL-6 抗体あるいは 25  $\mu$ g/ml の IL-6 R 抗体存在下で培養した。培養開始 72 時間後に 1  $\mu$ Ci / ウェルとなるように  $^3$ H チミジンを添加し、培養終了後にシンチレーションカウンターで細胞内の放射活性を測定した。結果を図 2 に示す。IL-6 抗体あるいは IL-6 R 抗体の添加により、sI

L-6Rにより増強された滑膜細胞の増殖を完全に抑制した。

(3) 滑膜細胞 ( $3 \times 10^3$  個/ウェル) を、 $100 \text{ ng/ml}$  の IL-6 (Genzyme 社製)、上記参考例にて得られた  $100 \text{ ng/ml}$  の sIL-6R および  $25 \mu\text{g/ml}$  の IL-6 抗体または IL-6R 抗体の存在下で培養した。培養開始後 72 時間に  $1 \mu\text{Ci}$ /ウェルとなるように  $^3\text{H}$ -チミジンを添加し、培養終了後にシンチレーションカウンターで細胞内の放射活性を測定した。結果を図 3 に示す。IL-6 抗体あるいは IL-6R 抗体の添加により、sIL-6R により増強された滑膜細胞の増殖は完全に抑制された。

#### 実施例 2.

マウス関節炎モデルでの関節炎発症に対する IL-6 レセプター抗体の抑制効果を調べた。

0.1N 酢酸水溶液に溶解したウシII型コラーゲン (コラーゲン技術研究会) 溶液 ( $4 \text{ mg/ml}$ ) と完全アジュバント H37Ra (DIFCO) を等量ずつ混合し、アジュバントを作成した。このアジュバント  $100 \mu\text{l}$  を 8-9 週令の雄性 DBA/1J マウス (日本チャールズリバー) の尾根部の皮下に注射した。更に、21 日後に背部皮下に  $100 \mu\text{l}$  を注射して関節炎を誘導した。

マウス IL-6 レセプター抗体 MR16-1 は、1 回目のコラーゲン感作時にマウス一匹あたり  $2 \text{ mg}$  を静脈内投与し、その後 1 週間毎に、マウス一匹あたり  $0.5 \text{ mg}$  を 7 週間皮下注射した ( $n=5$ )。なお、コントロールとして同じアイソタイプの抗 DNP 抗体 KH-5 抗体 (中外製薬) を使用した ( $n=5$ )。

関節炎発症の程度は、関節炎点数 (arthritic index) で評価した。一肢につき 4 点満点、一個体 16 点満点で評価した。評価の基準は以下のとおりである。0.5 : 関節の一箇所に紅斑が観察される。1 : 関節の二箇所に紅斑が観察される、または

甲が赤変しているが腫張は認められない。2：軽度の腫張が認められる。3：手足の甲に重度の腫張が認められるが、全ての指にそれが至らない。4：手足の甲および指に重度の腫張が認められる。

結果を図4に示す。IL-6レセプター抗体投与群ではコントロール抗体投与群に比べて関節炎発症初期から関節炎の発症が明らかに抑制された。

一方、マウスの血中抗II型コラーゲン抗体価を測定した結果、IL-6レセプター抗体投与群ではコントロール抗体投与群に比べて関節炎発症初期から著明に減少していた(図5)。

コラーゲン免疫後35日のマウスを屠殺し、その後肢を20%ホルマリンで固定した。これをEDTA溶液(pH7.6)中で脱灰し、アルコールにて脱水した。その後、これをパラフィン包埋し、2 $\mu$ m厚の切片を作成した。この切片をヘマトキシリンとエオジンで染色し125倍にて検鏡した(図6)。その結果、IL-6レセプター抗体投与群ではコントロール抗体投与群に比べて軟骨や骨への肉芽組織の侵潤すなわち慢性増殖性滑膜炎が抑制されていた。

IL-6は、B細胞を抗体産生細胞に分化させるサイトカインである。また、IL-6は、IL-6レセプター存在下で滑膜細胞の増殖も促進する。マウスコラーゲン関節炎モデルにおいて、抗IL-6レセプター抗体は、コラーゲン感作後21日目および35日目では、コントロール抗体投与群に比べて、抗II型コラーゲン抗体価を有意に抑制する結果が得られていることから、抗IL-6レセプター抗体による抗体産生抑制が関節炎の抑制作用の一因であると考えられる。一方、コラーゲン感作後49日以降ではそれほど抗体産生抑制効果が観察されないが、この時期でも関節炎の発症抑制効果が十分発揮されていること、また、足根骨周辺の組織をHE染色すると、抗IL-6レセプター抗体投与群では軟骨や、骨への肉芽組

織の浸潤がコントロール群に比べて抑制されていることから、滑膜の増殖抑制作用も関節炎の抑制効果に関与しているものと思われる。

#### 産業上の利用分野

慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞は I L - 6 と s I L - 6 R が共存する時に増殖する。慢性関節リウマチ患者の滑液中には滑膜細胞が増殖するのに十分な量の I L - 6 と s I L - 6 R が存在することから、I L - 6 によるシグナル伝達が慢性関節リウマチの滑膜細胞の異常な増殖に関与していることが示された。

本発明の I L - 6 アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤は I L - 6 と s I L - 6 R の共存下で慢性関節リウマチ由来滑膜細胞の増殖を抑制し、慢性関節リウマチの治療効果を有することが証明される。したがって、本発明の I L - 6 アンタゴニストは、滑膜細胞の異常な増殖がみられる慢性関節リウマチの治療剤として期待される。

## 請 求 の 範 囲

1. インターロイキン-6 アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤。
2. 前記インターロイキン-6 アンタゴニストが慢性関節リウマチにおいて滑膜細胞の異常な増殖を抑制することを特徴とする請求項1の慢性関節リウマチ治療剤。
3. 前記インターロイキン-6 アンタゴニストがインターロイキン-6 に対する抗体であることを特徴とする請求項1の慢性関節リウマチ治療剤。
4. 前記インターロイキン-6 がヒトインターロイキン-6 であることを特徴とする請求項2の慢性関節リウマチ治療剤。
5. 前記インターロイキン-6 アンタゴニストがインターロイキン-6 レセプターに対する抗体であることを特徴とする請求項1の慢性関節リウマチ治療剤。
6. 前記インターロイキン-6 レセプターがヒトインターロイキン-6 レセプターであることを特徴とする請求項2の慢性関節リウマチ治療剤。
7. インターロイキン-6 アンタゴニストを有効成分とする滑膜細胞増殖抑制剤。
8. 前記インターロイキン-6 アンタゴニストがインターロイキン-6 抗体又はインターロイキン-6 レセプター抗体である、請求項7に記載の滑膜細胞増殖抑制剤。

Fig.1

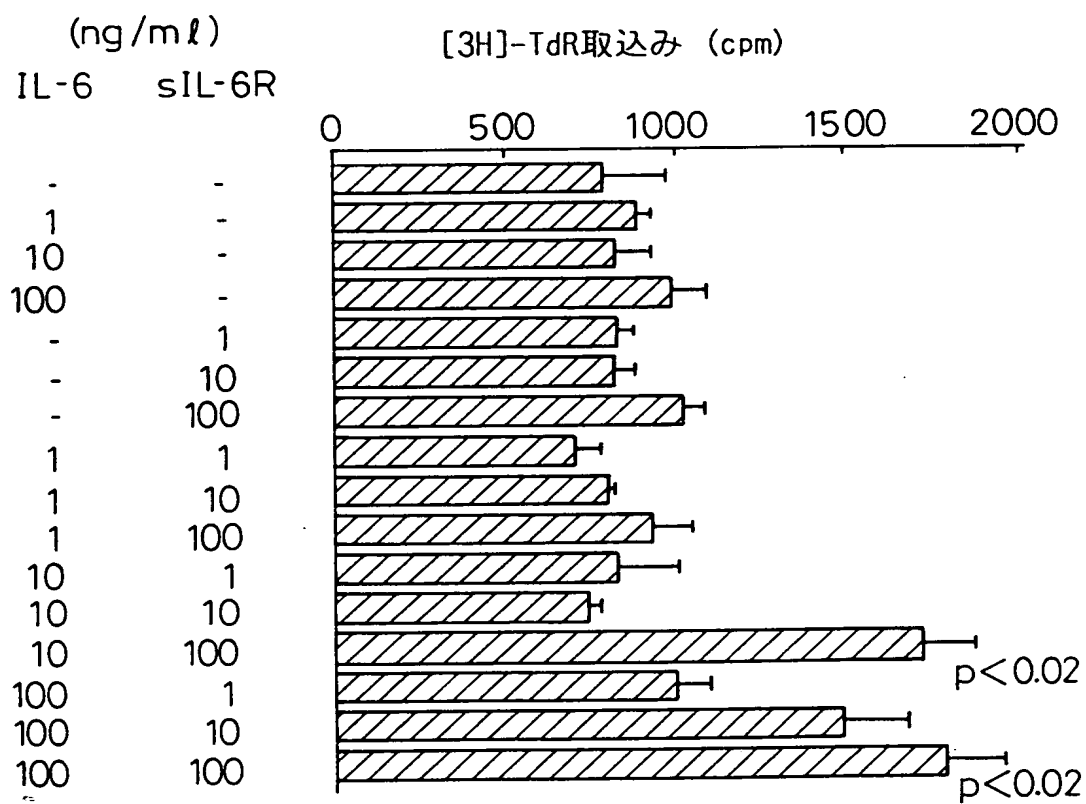




Fig. 2

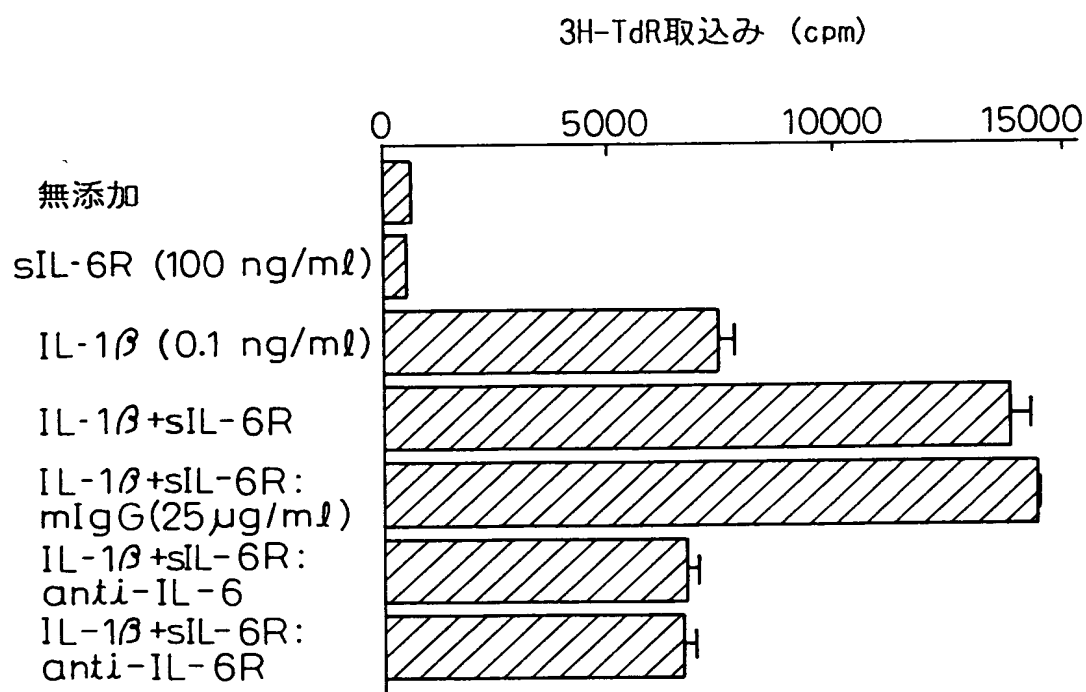


Fig. 3

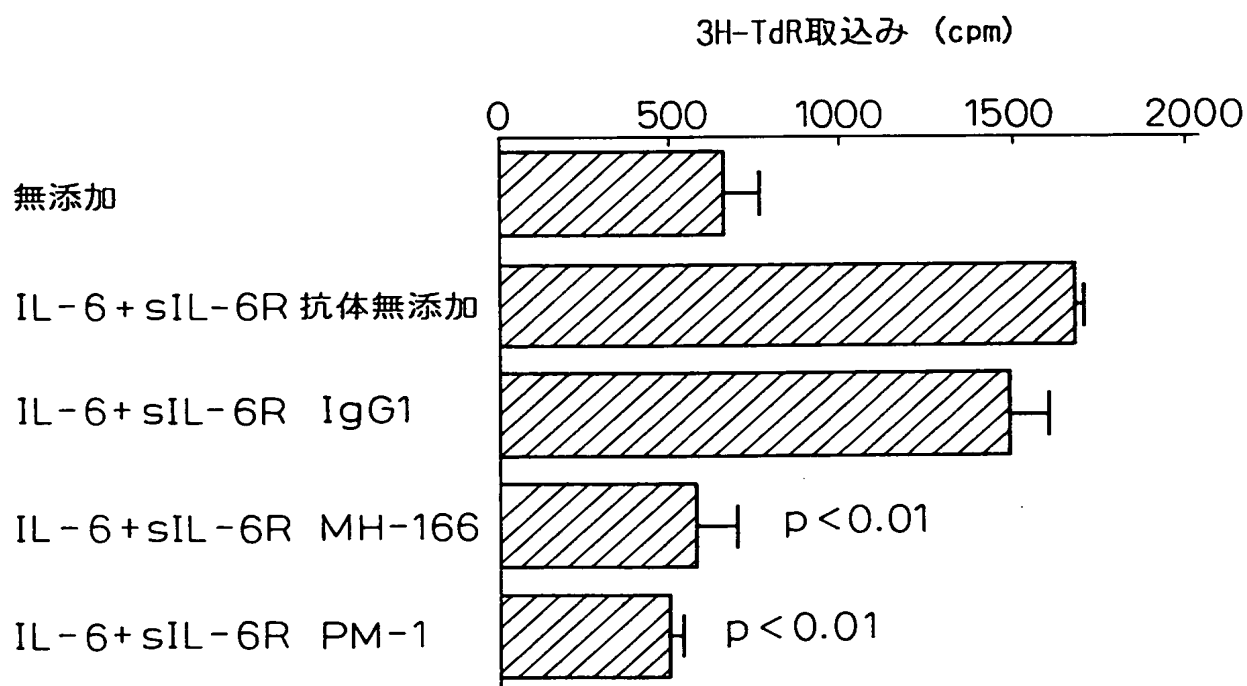


Fig. 4

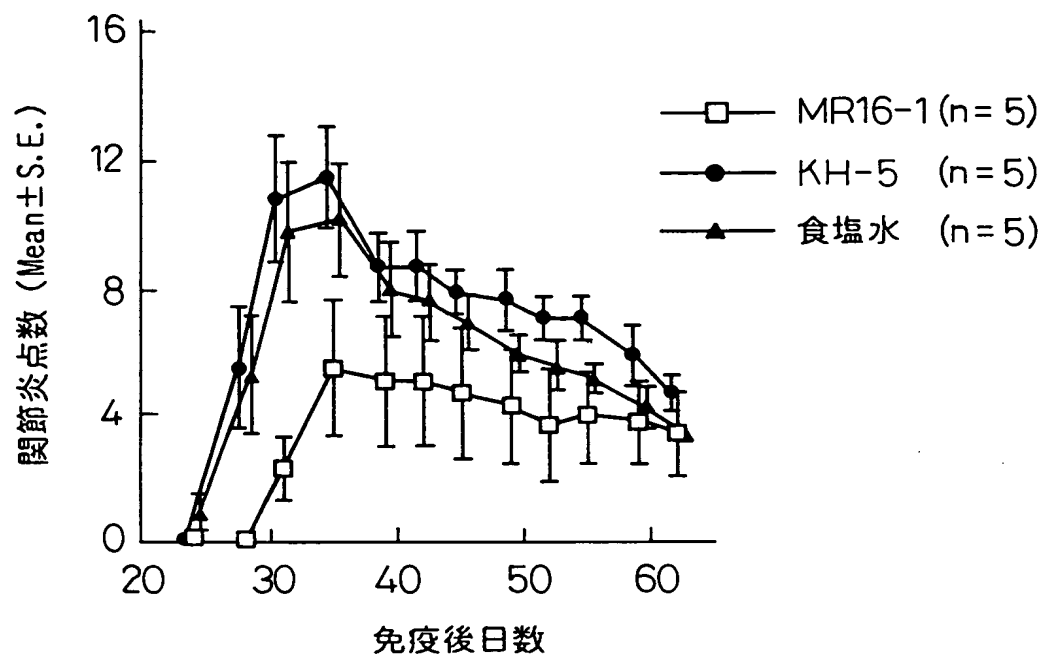


Fig. 5

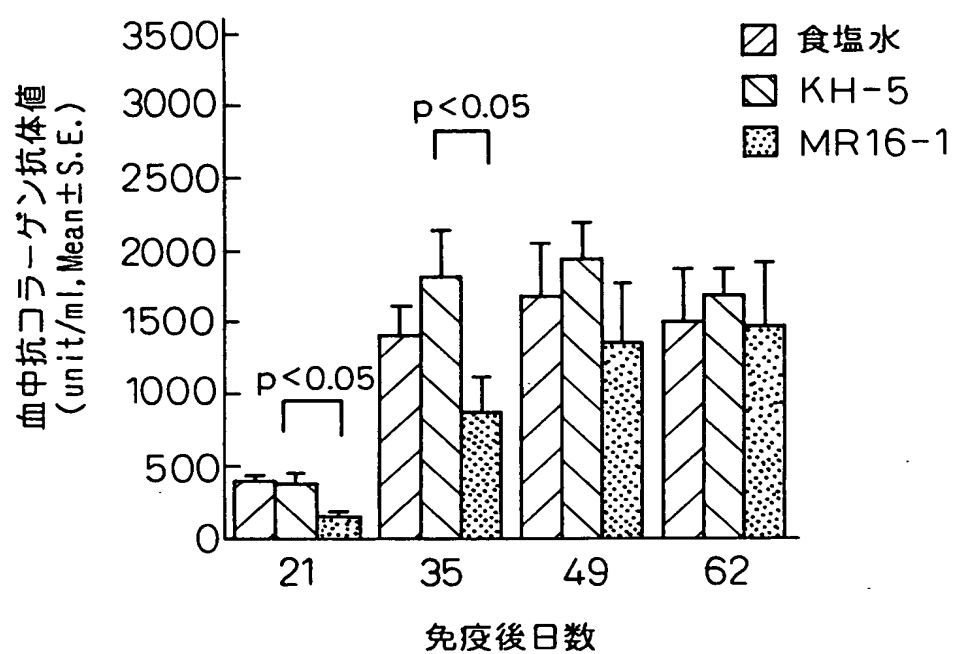


Fig. 6  
(a)



(b)



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01144

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> A61K39/395, A61K38/20//C12P21/08, C07K16/24, C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> A61K39/395, A61K38/20//C12P21/08, C07K16/24, C07K16/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,Y A	Harigai M. et al., J. Rheumatol., Vol. 15, No. 11 (1988), pp. 1616-1622	1 - 4 7, 8
X,Y A	Yasukawa K. et al., Toso Kenkyu Hokoku (Journal of Tosoh Research ), Vol. 35, No. 2 (1991), pp. 77-91	1, 2, 5, 6 7, 8
Y	Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol., Vol. 18 (1988), pp. 951-956	1 - 4
Y	Hirata U., et al., J. Ummunol., Vol. 143, No. 9 (1989), pp. 2900-2906	1, 2, 5, 6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 22, 1995 (22. 08. 95)

Date of mailing of the international search report

September 12, 1995 (12. 09. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A61K39/395, A61K38/20 / C12P21/08,  
C07K16/24, C07K16/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A61K39/395, A61K38/20 / C12P21/08,  
C07K16/24, C07K16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X.Y A	Harigai M. et al., J. Rheumatol., Vol. 15, no. 11 (1988), pp. 1616-1622	1-4 7.8
X.Y A	Yasukawa K. et al., Toso Kenkyu Hokoku (Journal of Toso Research), Vol. 35, no. 2 (1991), pp. 77-91	1, 2, 5.6 7.8
Y	Matsuda. T. et al., Eur. J. Immunol., Vol. 18 (1988), pp. 951-956	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
- 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 08. 95

国際調査報告の発送日

12.09.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘 實 謙 二

電話番号 03-3581-1101 内線

4 C 9 2 8 4

3 4 5 3

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Hirata U., et al., J. Immunol., Vol. 143, no. 9 (1989), pp. 2900-2906	1.2. 5.6